

GLUCOSE DEHYDROGENASEPatent Number: ☐ EP1176202

Publication date: 2002-01-30

Inventor(s): SODE KOJI (JP)

Applicant(s): SODE KOJI (JP)

Requested Patent: ☐ WO0066744

Application Number: EP20000922931 20000501

Priority Number(s): WO2000JP02872 20000501; JP19990124285 19990430; JP20000009137 20000118

IPC Classification: C12N15/53; C12N15/63; C12N9/04; C12N1/19; C12Q1/32; C12M1/34

EC Classification: C12N9/04

Equivalents:

Cited Documents:

Abstract

Modified water-soluble glucose dehydrogenases having pyrrolo-quinoline quinone as a coenzyme are provided wherein at least one amino acid residue is replaced by another amino acid residue in a specific region. Modified water-soluble PQQGDHs of the present invention have improved affinity for glucose.

Data supplied from the esp@cenet database - I2



PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類7 C12N 15/53, 15/63, 9/04, 1/19, C12Q 1/32, C12M 1/34</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO00/66744</p> <p>(43) 国際公開日 2000年11月9日(09.11.00)</p>						
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP00/02872</p> <p>(22) 国際出願日 2000年5月1日(01.05.00)</p> <p>(30) 優先権データ</p> <table border="0"> <tr> <td>特願平11/124285</td> <td>1999年4月30日(30.04.99)</td> <td>JP</td> </tr> <tr> <td>特願2000/9137</td> <td>2000年1月18日(18.01.00)</td> <td>JP</td> </tr> </table> <p>(71) 出願人 ; および</p> <p>(72) 発明者</p> <p>早出広司(SODE, Koji)[JP/JP]</p> <p>〒152-0013 東京都目黒区南1-13-16 Tokyo, (JP)</p> <p>(74) 代理人</p> <p>社本一夫, 外(SHAMOTO, Ichio et al.)</p> <p>〒100-0004 東京都千代田区大手町二丁目2番1号</p> <p>新大手町ビル206区 ユアサハラ法律特許事務所 Tokyo, (JP)</p>		特願平11/124285	1999年4月30日(30.04.99)	JP	特願2000/9137	2000年1月18日(18.01.00)	JP	<p>(81) 指定国 CA, CN, IL, KR, US, 欧州特許 (BE, DE, ES, FR, GB, IT, LU, NL)</p> <p>添付公開書類</p> <p>国際調査報告書</p>
特願平11/124285	1999年4月30日(30.04.99)	JP						
特願2000/9137	2000年1月18日(18.01.00)	JP						
<p>(54)Title: GLUCOSE DEHYDROGENASE</p> <p>(54)発明の名称 グルコース脱水素酵素</p> <p>(57) Abstract</p> <p>A modified glucose dehydrogenase characterized in that, in water soluble glucose dehydrogenase accompanied by pyrrolo-quinoline quinone as a coenzyme, one or more amino acid residues in a specific region has been substituted by other amino acid residue(s). This modified PQQGDH has an improved affinity for glucose.</p>								

(57)要約

ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、特定の領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素が提供される。本発明の改変型水溶性PQQGDHは、グルコースに対する改良された親和性を有する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スーダン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロヴェニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レソト	SK	スロヴァキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GB	英国	LU	ルクセンブルグ	SN	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	SZ	スワジランド
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TD	チャード
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサウ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
CA	カナダ	HR	クロアチア	ML	マリ	TZ	タンザニア
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UA	ウクライナ
CG	コンゴ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CH	スイス	IE	アイルランド	MW	マラウイ	US	米国
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MX	メキシコ	UZ	ウズベキスタン
CM	カメルーン	IN	インド	MZ	モザンビーク	VN	ヴェトナム
CN	中国	IS	アイスランド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラヴィア
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CU	キューバ	JP	日本	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CY	キプロス	KE	ケニア	NZ	ニュージーランド		
CZ	チェッコ	KG	キルギスタン	PL	ポーランド		
DE	ドイツ	KP	北朝鮮	PT	ポルトガル		
DK	デンマーク	KR	韓国	RO	ルーマニア		

明細書

グルコース脱水素酵素

5 技術分野

本発明はピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素（PQQ GDH）の製造、およびグルコースの定量におけるその使用に関する。

背景技術

血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーである。また、微生物を用いる発酵生産においては、プロセスをモニタリングするためにグルコース濃度を定量する。従来、グルコースはグルコースオキシダーゼ（GOD）あるいはグルコース6リン酸脱水素酵素（G6PDH）を用いる酵素法により定量されていた。しかし、GODを用いる方法ではグルコース酸化反応にともない発生する過酸化水素を定量するためカタラーゼあるいはパーオキシダーゼをアッセイ系に添加する必要がある。G6PDHは分光学的手法に基づくグルコース定量に用いられてきたが、反応系に補酵素であるNAD（P）を添加しなければならない。

したがって本発明はグルコースに対する改良された親和性を有する改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。本発明はまた、血中グルコース濃度測定之感度を増加させるために、グルコースに対する選択性が高い改変型水溶性PQQGDHを提供することを目的とする。

発明の開示

本出願人は、これまでのグルコース酵素定量方法に用いられてきた酵素にかわる新たな酵素としてグルコースに対する親和性の高いPQQGDHが有益であることを見いだした。

25 PQQGDHは、ピロロキノリンキノンを補酵素とするグルコース脱水素酵素であり、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する。

PQQGDHには、膜結合性酵素と水溶性酵素があることが知られている。膜結合性PQQGDHは、分子量約87kDaのシングルペプチド蛋白質であり、種々のグラム陰性菌において広く見いだされている。例えば、AM. C l e t

- on-Jansen et al., J. Bacteriol. (1990) 172, 6308-6315を参照されたい。一方、水溶性PQQGDHはAcinetobacter calcoaceticus のいくつかの株においてその存在が確認されており (Biosci. Biotech. Biochem. (1995), 59 (8), 1548-1555)、その構造遺伝子がクローニングされアミノ酸配列が明らかにされている (Mol. Gen. Genet. (1989), 217:430-436)。A. calcoaceticus 由来水溶性PQQGDHは、分子量約50 kDaのホモダイマーである。他のPQQ酵素とは蛋白質の一次構造上でのホモロジーがほとんどない。
- 10 最近、本酵素の X 線結晶構造解析の結果が報告され、活性中心をはじめとした本酵素の高次構造が明らかとなった。 (J.Mol.Biol., 289, 319-333(1999); The crystal structure of the apo form of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase from Acinetobacter calcoaceticus reveals a novel internal conserved sequence repeat; A.Oubrie et al., The EMBO Journal, 18(19) 5187-5194 (1999), Structure and mechanism of soluble quinoprotein glucose dehydrogenase, A. Oubrie et al., PNAS, 96(21), 11787-11791 (1999), Active-site structure of the soluble quinoprotein glucose dehydrogenase complexed with methylhydrazine: A covalent cofactor-inhibitor complex, A. Oubrie et al.)。これらの論文によれば、水溶性PQQGDHは 6 つのW-モチーフから構成されるβプロペラ蛋白質であることが明かとなった。
- 15
20

本発明者は従来の水溶性PQQGDHを改良してそのグルコースに対する親和性を高め、臨床検査や食品分析などに応用できる改変型PQQGDHを開発すべく鋭意研究を行なった結果、水溶性PQQGDHの特定の領域においてアミノ酸変異を導入することにより、グルコースに対する親和性が高い酵素を得ることに成功した。

25

すなわち、本発明は、ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース

脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対して親和性が向上していることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素を提供する。本発明の改変型PQQGDHはグルコースに対するKm値が天然型のPQQGDHのKm値より低く、好ましくは20mM未満であり、より好ましくは10mM未満である。

また好ましくは、本発明の改変型グルコース脱水素酵素は、グルコースに対する親和性は増加しているが、他の糖に対する親和性は変化していないかまたは低下しており、このことにより前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対して高い選択性を有する。特に、グルコースに対する反応性と比べて、ラクトースあるいはマルトースに対する反応性が野生型より低下している。好ましくは、グルコースに対する反応性を100%とした場合、ラクトースあるいはマルトースに対する活性が60%以下であり、より好ましくは50%以下であり、さらに好ましくは40%以下である。

本発明の1つの態様においては、本発明のPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第268残基から289残基または第448残基から第468残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基、すなわち天然に存在するPQQグルコース脱水素酵素中の対応するアミノ酸残基とは異なるアミノ酸残基で置換されている。なお、本明細書においては、アミノ酸の位置は、開始メチオニンを1として番号付けする。

本明細書においてアミノ酸残基または領域に関して用いる場合、「相当する」との用語は、構造上類似するが同一ではない2以上の蛋白質において、あるアミノ酸残基または領域が等価の機能を有することを表す。例えば、*Acinetobacter calcoaceticus* 以外の生物に由来する水溶性PQQGDHにおいて、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第268残基から289残基の領域とアミノ酸配列類似性の高い領域が存在し、かつ蛋白質の二次構造から見て該領域がその蛋白質において同じ役割を果たしていると合理的に考えられる場合、該領域は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由

来水溶性PQQGDHの第268残基から289残基の領域に相当する」と言われる。さらに、該領域の第10番目のアミノ酸残基は「*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第277残基に相当する」と言われる。

- 5 好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の277番目のグルタミン酸残基、278番目のイソロイシン残基、462番目のアスパラギン残基、452番目のアスパラギン残基、455番目のリジン残基、456番目のアスパラギン酸残基、457番目のアスパラギン酸残基または448番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基の1またはそれ以上
10 がそれぞれ他のアミノ酸残基で置換されている。

- さらに好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の277番目のグルタミン酸残基が、アラニン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、ヒスチジン、グルタミン、バリンおよびグリシンからなる群より選択されるアミノ酸残基で置換されているか、または278番目のイソロ
15 イシン残基がフェニルアラニン残基で置換されている。

また別の観点においては、本発明の改変型PQQGDHは、配列：

Xaa8 Thr Ala Gly Xaa1 Val Gln Xaa2 Xaa3 Xaa4 Gly Ser Val
Thr Xaa5 Thr Leu Glu Asn Pro Gly

- (式中、Xaa1、Xaa2、Xaa3、Xaa4、Xaa5 および Xaa8 は任意の天然アミノ酸
20 残基である、ただし、Xaa1 が Asn であり、Xaa2 が Lys であり、Xaa3 が Asp であり、Xaa4 が Asp であり、かつ Xaa5 が Asn であるとき、Xaa8 は Asp で
はない)を含む。

また別の観点においては、本発明の改変型PQQGDHは、配列：

- Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Xaa6 Xaa7 Asn Leu Ile
25 Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp

[式中、Xaa6 および Xaa7 は任意の天然アミノ酸残基であるが、ただし、
Xaa6 が Glu であるとき Xaa7 は Ile ではない] を含む。

本発明はまた、上述の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子、該遺伝子を含むベクターおよび該遺伝子を含む形質転換体、ならびに本発明の改変型

グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキットおよびグルコースセンサーを提供する。

- 本発明の改変型PQQGDHの酵素蛋白質はグルコースに対して高い親和性を示し、かつグルコースに対して高い酸化活性を有していることから、グルコース
- 5 の高感度かつ高選択的な測定に応用できる。

図面の簡単な説明

図1は、本発明において用いたプラスミドpGB2の構造を示す。

- 図2は、本発明の改変型酵素をコードする突然変異遺伝子を作成する方法を示
- 10 す。

図3は、本発明の改変型PQQGDHを用いるグルコースのアッセイを示す。

発明を実施するための最良の形態

改変型PQQGDHの構造

- 15 本発明者は、水溶性PQQGDHをコードする遺伝子のコーディング領域中にエラープローンPCR法によりランダムに変異を導入し、アミノ酸残基の変異が導入された水溶性PQQGDHのライブラリーを構築した。これを大腸菌に形質転換し、グルコースに対するPQQGDHの活性についてスクリーニングして、20mM濃度のグルコースに対する活性が100mMのグルコースに対する活性
- 20 と同等であり、低濃度のグルコースに対して野生型酵素より反応性が向上したPQQGDHを発現する多数のクローンを得た。

- これらのクローンの一つについて遺伝子配列を解析したところ、第277番目のG1uがG1yに置換されていることが判明した。さらにこの残基を種々の別のアミノ酸残基に置換したところ、いずれの残基に置換しても野生型水溶性PQ
- 25 QGDHよりもグルコースに対する親和性が向上した優れた変異酵素が得られた。

次に、第277番目の残基の近傍の他の残基に関して部位特異的に変異を導入し、グルコースに対する親和性を測定した。第268残基から289残基の領域中の、278番目のI1eをP1eに置換した改変型酵素、および279番目のA1nをH1sに置換した改変型酵素を作成し、その活性を測定したところ、こ

これらの改変型酵素はグルコースに対して高い親和性を有していた。

さらに、上記多数のクローンから、20 mM濃度のグルコースに対する活性が野生型PQQGDHと同等であるが、20 mMのラクトースに対する活性が野生型PQQGDHより低下したPQQGDHを発現するクローンを選択した。

- 5 これらのクローンの一つについて遺伝子配列を解析したところ、第452番目のAsnがAspに置換されていることが判明した。次に、この残基をトレオニン、リジン、イソロイシン、ヒスチジンあるいはアスパラギン酸残基に置換したところ、いずれの残基に置換しても野生型水溶性PQQGDHよりもグルコースに対する選択性が向上した優れた変異酵素が得られた。さらに、第452番目の
- 10 残基の近傍の他のアミノ酸残基に対しても同様に変異を導入した。第455番目のリジン残基をイソロイシン残基に、第456番目のアスパラギン酸残基をアスパラギン残基に、第457番目のアスパラギン酸残基をアスパラギン残基に、第462番目のアスパラギン酸残基をアスパラギン酸残基に、第448番目のアスパラギン酸残基をアスパラギン残基にそれぞれ置換した変異酵素を構築した。その
- 15 結果、表4に示すように、いずれの変異酵素においてもグルコースに対する選択性が向上したことがわかった。

- 本発明の好ましいPQQグルコース脱水素酵素においては、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第448残基から第468残基に相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。好ましくは、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1で表されるアミノ酸配列の462番目のアスパラギン残基、452番目のアスパラギン残基、455番目のリジン残基、456番目のアスパラギン酸残基、457番目のアスパラギン酸残基および第448番目のアスパラギン酸残基に相当するアミノ酸残基の1またはそれ以上が他のアミノ酸残基で置換されている。
- 20

- 25 また別の観点においては、本発明の改変型PQQGDHは、配列：

Xaa8 Thr Ala Gly Xaa1 Val Gln Xaa2 Xaa3 Xaa4 Gly Ser Val
Thr Xaa5 Thr Leu Glu Asn Pro Gly

(式中、Xaa1、Xaa2、Xaa3、Xaa4、Xaa5 および Xaa8 は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1 が Asn であり、Xaa2 が Lys であり、Xaa3 が Asp

であり、Xaa4 が Asp であり、かつ Xaa5 が Asn であるとき、Xaa8 は Asp で
はない)を含む。

本発明の別の好ましい改変型 PQQGDH は、配列番号 1 で表されるアミノ酸
配列の第 268 残基から 289 残基の領域において、1 またはそれ以上のアミノ
5 酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている。さらに、本発明の特に好ましい改
変型 PQQGDH は、配列番号 1 で表されるアミノ酸配列の 277 番目のグルタ
ミン酸残基が、アラニン、アスパラギン、リジン、アスパラギン酸、ヒスチジン、
グルタミン、バリンおよびグリシンからなる群より選択されるアミノ酸残基で置
換されているか、または 278 番目のイソロイシン残基がフェニルアラニン残基
10 で置換されている。

また別の観点においては、本発明の改変型 PQQGDH は、配列：

Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Xaa6 Xaa7 Asn Leu Ile
Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp

[式中、Xaa6 および Xaa7 は任意の天然アミノ酸残基であるが、ただし、
15 Xaa6 が Glu であるとき Xaa7 は Ile ではない] を含む。

本発明の改変型グルコース脱水素酵素においては、グルコースデヒドロゲナー
ゼ活性を有する限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されてい
てもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。

さらに、当業者は、他の細菌に由来する水溶性 PQQGDH についても、本発
20 明の教示にしたがってアミノ酸残基を置換することにより、グルコースに対する
親和性が向上した改変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。特に、蛋白
質の一次構造を並列して比較すること、あるいは当該酵素の一次構造をもとに予
測された二次構造を比較することにより、*Acinetobacter calcoaceticus*
由来の水溶性 PQQGDH の 277 番目のグルタミン酸残基および 278 番目の
25 イソロイシン残基、462 番目のアスパラギン残基、452 番目のアスパラギン
残基、455 番目のリジン残基、456 番目のアスパラギン酸残基、457 番目
のアスパラギン酸残基および第 448 番目のアスパラギン酸残基に相当するアミ
ノ酸残基に相当するアミノ酸残基を容易に認識することができる。本発明にした
がって、そのような置換を行うことにより、基質に対する親和性が改良された改

変型グルコース脱水素酵素を得ることができる。これらの改変型グルコース脱水素酵素も本発明の範囲内である。

改変型PQQGDHの製造方法

5 *Acinetobacter calcoaceticus* 由来の天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子の配列は配列番号2で規定される。

本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、天然の水溶性PQQGDHをコードする遺伝子において、特定のアミノ酸残基をコードする塩基配列を、変異すべきアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換することにより構築することができる。このような部位特異的塩基配列置換のための種々の方法が当該技術分野において知られており、例えば、Sambrook ら, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 第2版, 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York に記載されている。

15 このようにして得た変異遺伝子を遺伝子発現用のベクター（例えばプラスミド）に挿入し、これを適当な宿主（例えば大腸菌）に形質転換する。外来性蛋白質を発現させるための多くのベクター・宿主系が当該技術分野において知られており、宿主としては例えば、細菌、酵母、培養細胞などの種々のものを用いることができる。

ランダム変異を導入する場合には、標的とする領域においてエラープローンPCR法によりランダムに変異を導入し、その標的領域に変異が導入された変異水溶性PQQGDH遺伝子ライブラリーを構築する。これを大腸菌に形質転換し、PQQGDHのグルコースに対する親和性について各クローンをスクリーニングする。水溶性PQQGDHは大腸菌において発現させたときにペリプラズム空間に分泌されるため、菌体そのものを用いて容易に酵素活性の検定を行うことができる。このライブラリーに、20mMグルコース存在下で色素としてPMS-D
20 CIPを加え、PQQGDHの活性を目視により判定して、グルコース100mMに対する活性と同等な活性を示すクローンを選択し、遺伝子配列を解析してその変異を確認する。

さらに、グルコースに対する選択性が向上した改変型PQQGDHを得るためには、このライブラリーに色素としてPMS-DCIPを加え、PQQGDHの

活性を目視により判定して、20 mM濃度のグルコースに対する活性が野生型PQQGDHと同等であるが、20 mMのラクトースに対する活性が野生型PQQGDHより低下したPQQGDHを発現するクローンを選択し、遺伝子配列を解析してその変異を確認する。

- 5 上述のようにして得られた、改変型PQQGDHを発現する形質転換体を培養し、培養液から遠心分離などで菌体を回収した後、菌体をフレンチプレスなどで破碎するか、またはオスモティックショックによりペリプラズム酵素を培地中に放出させる。これを超遠心分離し、PQQGDHを含む水溶性画分を得ることができる。あるいは、適当な宿主ベクター系を用いることにより、発現したPQQGDHを培養液中に分泌させることもできる。得られた水溶性画分を、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、HPLCなどにより精製することにより、本発明の改変型PQQGDHを調製する。
- 10

酵素活性の測定方法

- 本発明のPQQGDHは、PQQを補酵素として、グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒する作用を有する。
- 15

- 酵素活性の測定は、PQQGDHによるグルコースの酸化にともなって還元されるPQQの量を酸化還元色素の呈色反応により定量することができる。呈色試薬としては、例えば、PMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）、フェリシアン化カリウム、フェロセンなどを用いることができる。
- 20

グルコースに対する親和性

- 本発明の改変型PQQGDHはグルコースに対する親和性が野生型の親和性より大幅に向上している。すなわち、改変型PQQGDHのグルコースに対するKm値は、野生型PQQGDHのグルコースに対するKm値より大幅に低い。改変型PQQGDHの中でもGlu277Lysのグルコースに対するKm値は8.8 mMであり、また最大活性も野生型酵素と遜色ないことから、低い濃度のグルコースに対する反応性が向上している。
- 25

したがって、本改変型酵素を用いて作成されたアッセイキットあるいは酵素センサーはグルコース測定に関して感度が高く、低い濃度のグルコースが検出でき

るなどの優れた利点を有する。

選択性の評価方法

- 本発明のPQQGDHのグルコースに対する選択性は、基質として、2-デオキシ-D-グルコース、マンノース、アロース、3-オ-メチル-D-グルコース、ガラクトース、キシロース、ラクトースおよびマルトース等の各種の糖を用いて上述のように酵素活性を測定し、グルコースを基質としたときの活性に対する相対活性を調べることにより評価することができる。

グルコースアッセイキット

- 本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

グルコースセンサー

- 本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化したが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグル

タルアルデヒドをブロッキングする。

- グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよび CaCl_2 、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメ
5 トサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えば Ag/AgCl 電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料
10 中のグルコース濃度を計算することができる。

- 本明細書において明示的に引用される全ての特許および参考文献の内容は全て引用により本明細書に取り込まれるものとする。また、本出願が有する優先権主張の基礎となる出願である日本特許出願平成11-124285号および2000-9137号の明細書に記載の内容は全て引用により本明細書に取り込まれる
15 ものとする。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されることはない。

以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

20 実施例1

変異PQQGDH遺伝子ライブラリの構築およびスクリーニング

- プラスミドpGB2は、ベクターpTrc99A（ファルマシア社製）のマルチクローニング部位に、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来PQQGDHをコードする構造遺伝子を挿入したものである（図1）。このプラスミドをテン
25 プレートとして、エラーブローンPCR法により種々の領域中にランダムに変異を導入した。PCR反応は、表1に示す組成の溶液中で、94℃3分間、次に、94℃3分間、50℃2分間、および72℃2分間を30サイクル、最後に72℃で10分間の条件で行った。

表1

Taq DNAポリメラーゼ (5 U/ μ l)	0.5 μ l
テンプレートDNA	1.0 μ l
フォワードプライマーABF	4.0 μ l
リバープライマーABR	4.0 μ l
10×Taqポリメラーゼバッファー	10.0 μ l
1M β -メルカプトエタノール	1.0 μ l
DMSO	10.0 μ l
5mMMnCl ₂	10.0 μ l
10mMdGTP	2.0 μ l
2mMdATP	2.0 μ l
10mMdCTP	2.0 μ l
10mMdTTP	2.0 μ l
H ₂ O	51.5 μ l
	100.0 μ l

- 得られた変異水溶性PQQGDHのライブラリーを大腸菌に形質転換し、形成
- 5 された各コロニーをマイクロタイタープレートに移した。コロニーを別のプレートにレプリカし、片方のプレートにはグルコース濃度10mMおよびPMS-DCIPを加え、他方のプレートには100mMグルコースおよびPMS-DCIPを加え、双方のPQQGDHの活性を目視で判定した。2枚のプレートで同等のPQQGDHの活性を示すクローンが多数得られた。
- 10 このうち1つのクローンを任意に選び、遺伝子配列を解析したところ、第277番目のグルタミン酸がグリシンに変異していたことがわかった。

実施例2

- 実施例1で得られた各コロニーをマイクロタイタープレートに移した。コロニー
- 15 を別のプレートにレプリカし、片方のプレートにはグルコース濃度20mMおよびPMS-DCIPを加え、他方のプレートには20mMラクトースおよびP

MS-DCIPを加え、双方のPQQGDHの活性を目視で判定した。2枚のプレートでグルコースの示す活性よりもラクトースに対する活性が大幅に低下したクローンが多数得られた。

- このうち1つのクローンを任意に選び、遺伝子配列を解析したところ、452番目のアスパラギンがアスパラギン酸に変異していたことがわかった。

実施例3

改変型酵素PQQGDH遺伝子の構築

- 配列番号2に示される *Acinetobacter calcoaceticus* 由来PQQGDHの構造遺伝子をもとに、常法に従って部位特異的変異法により277番目のグルタミン酸残基または278番目のイソロイシン残基をコードする塩基配列を所定のアミノ酸残基をコードする塩基配列に置換した。部位特異的変異はプラスミドpGB2を用いて、図2に示す方法により行った。変異に用いた合成オリゴヌクレオチドターゲットプライマーの配列を表2に示す。表2においては、例えば「E277A」は、277番目のグルタミン酸がアスパラギン酸に置換されていることを表す。

表2

E277A	5'-	GAG GTT AAT TGC ATC GTC AGA G	-3'
E277N	5'-	C AAT GAG GTT AAT GTT ATC GTC AGA GTT TG	-3'
E277K	5'-	GAG GTT AAT ATC ATC GTC AGA G	-3'
E277D	5'-	GAG GTT AAT TTT ATC GTC AGA G	-3'
E277H	5'-	C AAT GAG GTT AAT GTG ATC GTC AGA GTT TG	-3'
E277Q	5'-	GAG GTT AAT TTG ATC GTC AGA G	-3'
E277V	5'-	C AAT GAG GTT AAT TAC ATC GTC AGA GTT TG	-3'
E277G	5'-	GAG GTT AAT TCC ATC GTC AGA G	-3'
I278F	5'-	C AAT GAG GTT GAA TTC ATC GTC AGA G	-3'
N279H	5'-	GAC AAT GAG GTG AAT TTC ATC GTC AGA GTT	-3'

ベクタープラスミド pKF18k (宝酒造 (株)) に *Acinetobacter calcoaceticus* 由来PQQGDHをコードする遺伝子の一部を含む Kpn I-Hind III 断片を組み込み、これをテンプレートとした。このテンプレート 5
0 fmol と宝酒造 (株) 製Mutan (登録商標) -Express Kmキ
ットに付属のセレクションプライマー 5 pmol、リン酸化したターゲットプ
ライマー 50 pmol を全体 (20 μ l) の 1/10 量の同キットのアニーリング
バッファーとともに混合し、100°C、3 分間の熱処理でプラスミドを変性させ、
1 本鎖にした。セレクションプライマーは pKF18k のカナマイシン耐性遺伝
10 子上にある二重のアンバー変異を復帰させるためのものである。これを 5 分間氷
上に置き、プライマーをアニーリングさせた。これに 3 μ l の同キットエクステ
ンションバッファー、1 μ l の T4 DNA リガーゼ、1 μ l の T4 DNA ポ
リメラーゼおよび 5 μ l の滅菌水を加えて相補鎖を合成した。

これを DNA のミスマッチ修復能欠損株である *E.coli* BMH71-18
15 *mutS* に形質転換し、一晚振とう培養を行ってプラスミドを増幅させた。

次に、ここから抽出したプラスミドを *E.coli* MV1184 に形質転換し、
そのコロニーからプラスミドを抽出した。そしてこれらのプラスミドについてシ
ークエンスを行い、目的とした変異の導入を確認した。この断片を、プラスミド
pGB2 上の野生型 PQQGDH をコードする遺伝子の Kpn I-Hind III 断片
20 と入れ替え、改変型 PQQGDH の遺伝子を構築した。

同様にして、配列：

5'-C ATC TTT TTG GAC ATG TCC GGC AGT AT-3'

のオリゴヌクレオチドターゲットプライマーを合成し、452 番目のアスパラギ
ンをヒスチジンに置換した。部位特異的変異はプラスミド pGB2 を用いて、図
25 2 に示す方法により行った。さらに、Asp448Asn、Asn452Asp、Asn452His、
Asn452Lys、Asn452Thr、Asn452Ile、Lys455Ile、Asp456Asn、
Asp457Asn、Asn462Asp の各変異を有する改変型 PQQGDH の遺伝子を構
築した。

実施例 4

改変型酵素の調製

野生型または改変型PQQGDHをコードする遺伝子を、E. coli用の発現ベクターであるpTrc99A（ファルマシア社）のマルチクローニングサイトに挿入し、構築されたプラスミドをE. coli DH5 α 株に形質転換した。これを450mlのL培地（アンピシリン50 μ g/ml、クロラムフェニコール30 μ g/ml含有）で坂口フラスコを用いて37 $^{\circ}$ Cで一晩振とう培養し、1mM CaCl₂、500 μ M PQQを含む7lのL培地に植菌した。培養開始後約3時間でイソプロピルチオガラクトシドを終濃度0.3mMになるように添加し、その後1.5時間培養した。培養液から遠心分離（5000 \times g、10分、4 $^{\circ}$ C）で菌体を回収し、この菌体を0.85%NaCl溶液で2回洗浄した。集菌した菌体をフレンチプレスで破碎し、遠心分離（10000 \times g、15分、4 $^{\circ}$ C）で未破碎の菌体を除去した。上清を超遠心分離（160500 \times g（40000r.p.m.）、90分、4 $^{\circ}$ C）し、水溶性画分を得た。これを粗精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

さらに、こうして得た水溶性画分を10mMリン酸緩衝液pH7.0で一晩透析した。透析したサンプルを10mMリン酸緩衝液pH7.0で平衡化した陽イオン交換クロマトグラフィー用充填カラムTSK gel CM-TOYOPEARL 650M（東ソー株式会社）に吸着させた。このカラムを10mMリン酸緩衝液pH7.0、750mlで洗浄した後、0-0.2M NaClを含む10mMリン酸緩衝液pH7.0を用い、酵素を溶出させた。流速は5ml/minで行った。GDH活性を有する画分を回収し、10mM MOPS-NaOH緩衝液（pH7.0）で一晩透析した。このようにして電気泳動的に均一な改変型PQQGDH蛋白質を得た。これを精製酵素標品として以下の実施例において用いた。

実施例 5

酵素活性の測定

酵素活性の測定は、室温において、10mM MOPS-NaOH緩衝液（p

- H7.0) 中においてPMS (フェナジンメトサルフェート) -DCIP (2,6-ジクロロフェノールインドフェノール) を用い、DCIPの600nmの吸光度変化を分光光度計を用いて追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1 μmol のDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は16.3 mM^{-1} とした。

実施例6

粗精製酵素標品グルコースに対する親和性の評価

- 10 実施例4で得られた野生型および各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品をそれぞれ1 μMPQQ 、1 mM CaCl_2 存在下で1時間以上ホロ化した。これを187 μl ずつ分注し、3 μl の活性試薬 (6 mMDCIP 48 μl 、600 mMPMS 8 μl 、10 mM リン酸緩衝液pH7.0 16 μl) および各濃度のD-グルコース溶液10 μl を加え、実施例5に示す方法により室温で酵素
- 15 活性を測定した。基質濃度対酵素活性のプロットから、 K_m を求めた。結果を表3に示す。

表 3

	Km (mM)
野生型	26.0
G277A	1.5
G277N	1.2
G277K	8.9
G277D	7.4
G277H	7.7
G277Q	4.3
G277V	2.5
G277G	0.3
I278F	7.0
N279H	15.7
N452T	12.5
N462D	12.2
N462K	11.0
N462Y	20.4

5 これまで報告されている野生型PQQGDHのグルコースに対するKm値は約25mMである。これに対して、今回構築した277番目のグルタミン酸残基に変異を導入した酵素および278番目のイソロイシンをフェニルアラニンに置換した酵素では、いずれもグルコースに対するKm値は10mM未満であった。この結果から、本発明の改変型PQQGDHはグルコースに対して高い親和性を有する酵素であることがわかる。

10

実施例 7

精製酵素標品のグルコースに対する親和性の評価

実施例 4 で得られた野生型酵素および Glu277Lys 改変型酵素の精製酵素標品を用いて、実施例 6 と同様にそれぞれ $1 \mu\text{M}$ PQQ、 1mM CaCl_2 存在下

で1時間以上ホロ化した。これを187 μ lずつ分注し、3 μ lの活性試薬(6mM DCIP 48 μ l, 600mM PMS 8 μ l, 10mMリン酸緩衝液pH 7.0 16 μ l)および各濃度のD-グルコース溶液10 μ lを加え、実施例5に示す方法により室温で酵素活性を測定した。基質濃度対酵素活性のプロットから、KmおよびVmaxを求めた。Glu277Lysのグルコースに対するKm値は約8.8mMであり、Vmax値は3668U/mgであった。これまで報告されている野生型PQQGDHのグルコースに対するKm値は約25mMであり、Vmax値は測定条件により2500-7000U/mgである。この結果から、Glu277Lys 改変型PQQGDHはグルコースに対する親和性が大幅に向上し、かつ、野生型PQQGDHに匹敵する高い活性を有する酵素であることがわかる。

実施例8

基質特異性の評価

各改変型酵素の粗精製酵素標品について基質特異性を調べた。実施例4で得られた野生型および各改変型PQQGDHの粗精製酵素標品をそれぞれ1 μ MPQQ、1mM CaCl₂存在下で1時間以上ホロ化した。これを187 μ lずつ分注し、3 μ lの活性試薬(6mM DCIP, 600mM PMS, 10mMリン酸緩衝液pH 7.0を含む)および基質を加えた。基質として、それぞれ終濃度20mMとなるように400mMのグルコース、ラクトースおよびマルトースを10 μ l加え、室温で30分間インキュベートして、実施例5と同様に酵素活性を測定した。値はグルコースを基質としたときの活性を100とし、これに対する相対活性で表した。表4に示されるように、本発明の改変型酵素はいずれも野生型酵素と比較してグルコースに対する高い選択性を示した。

表 4

	グルコース	ラクトース	マルトース
野生型	100%	61%	61%
Asp448Asn	100%	48%	36%
Asn452Asp	100%	56%	50%
Asn452His	100%	39%	39%
Asn452Lys	100%	55%	42%
Asn452Thr	100%	42%	30%
Asn452Ile	100%	36%	28%
Lys455Ile	100%	49%	37%
Asp456Asn	100%	59%	41%
Asp457Asn	100%	43%	32%
Asn462Asp	100%	52%	41%

実施例 9

5 グルコースのアッセイ

改変型PQQGDHを用いてグルコースをアッセイした。Glu277Lys 改変型酵素および Asn452Thr 改変型酵素をそれぞれ、1 μ M PQQ、1 mM CaCl₂存在下で1時間以上ホロ化し、各種濃度のグルコースおよび5 μ M PQQ、10 mM CaCl₂存在下で酵素活性を測定した。方法は実施例 5 に記載の酵素活性の測定法に準じ、DCIPの600 nmの吸光度の変化を指標とした。図3に示されるように、Asn452Thr 改変型PQQGDHを用いて、0.1 - 20 mMの範囲でグルコースの定量を行うことができた。また、Glu277Lys 改変型PQQGDHについても同様の結果が得られた。

15 実施例 10

酵素センサーの作製および評価

5 ユニットの Glu277Lys 改変型酵素および Asn452Thr 改変型酵素にそれぞれカーボンペースト20 mgを加えて凍結乾燥させた。これをよく混合した後、

- 既にカーボンペーストが約40mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、濾紙上で研磨した。この電極を1%のグルタルアルデヒドを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で30分間処理した後、20mM リジンを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で20分間処理
- 5 してグルタルアルデヒドをブロッキングした。この電極を10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で室温で1時間以上平衡化させた。電極は4℃で保存した。

作製した酵素センサーを用いてグルコース濃度の測定を行った。本発明の改変型PQQGDHを固定化した酵素センサーを用いて、0.1mM-5mMの範囲でグルコースの定量を行うことができる。

10 産業上の利用性

改変型PQQGDHはグルコースに対する親和性が高いことから、本酵素を用いてアッセイキットあるいは酵素センサーを作成すると従来の天然型のPQQGDHを用いた場合に比べ、より低濃度のグルコース測定が可能であり、また大幅な感度の向上といった利点が期待される。

15

請求の範囲

1. ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、天然の水溶性グルコース脱水素酵素の1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されており、かつ前記天然の水溶性グルコース脱水素酵素と比較してグルコースに対する親和性が高いことを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。
2. 野生型のPQQGDHと比較してグルコースに対する高い選択性を有する、請求項1記載の改変型グルコース脱水素酵素。
3. ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの462番目のアスパラギン残基もしくは該残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
4. ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの452番目のアスパラギン残基もしくは該残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
5. ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの455番目のリジン残基もしくは該残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
6. ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの456番目のアスパラギン酸残基もしくは該残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
7. ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの457番目のアスパラギン酸残基もしくは該残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。

8. ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの448番目のアスパラギン酸残基もしくは該残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
- 5 9. ピロロキノリンキノンを補酵素とするPQQグルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの第268残基から第289残基もしくは第448残基から第468残基の領域またはそれに相当する領域において1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。
- 10 10. ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの277番目のグルタミン酸残基もしくは該残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
- 15 11. ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、*Acinetobacter calcoaceticus* 由来水溶性PQQGDHの278番目のイソロイシン残基もしくは該残基に相当するアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている改変型グルコース脱水素酵素。
- 20 12. ピロロキノリンキノンを補酵素とする水溶性グルコース脱水素酵素において、配列番号1で表されるアミノ酸配列の、第268残基から289残基または第448残基から第468残基の領域において、1またはそれ以上のアミノ酸残基が他のアミノ酸残基で置換されていることを特徴とする改変型グルコース脱水素酵素。
13. 配列
- Xaa8 Thr Ala Gly Xaa1 Val Gln Xaa2 Xaa3 Xaa4 Gly Ser Val
- 25 Thr Xaa5 Thr Leu Glu Asn Pro Gly
- (式中、Xaa1、Xaa2、Xaa3、Xaa4、Xaa5 および Xaa8 は任意の天然アミノ酸残基である、ただし、Xaa1 が Asn であり、Xaa2 が Lys であり、Xaa3 が Asp であり、Xaa4 が Asp であり、かつ Xaa5 が Asn であるとき、Xaa8 は Asp でない)を含む、PQQグルコース脱水素酵素。

14. 配列:

Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Xaa6 Xaa7 Asn Leu Ile
Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp

- 5 [式中、Xaa6およびXaa7は任意の天然アミノ酸残基であるが、ただし、Xaa6がGluであるときXaa7はIleではない]を含む、PQQグルコース脱水素酵素。

15. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の277番目のグルタミン酸残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項14記載の改変型グルコース脱水素酵素。

- 10 16. 配列番号1で表されるアミノ酸配列の278番目のイソロイシン残基が他のアミノ酸残基で置換されている、請求項14記載の改変型グルコース脱水素酵素。

17. 請求項1-16のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素をコードする遺伝子。

- 15 18. 請求項16に記載の遺伝子を含むベクター。

19. 請求項16に記載の遺伝子を含む形質転換体。

20. 請求項16に記載の遺伝子が主染色体に組み込まれている、請求項20記載の形質転換体。

- 20 21. 請求項1-16のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースアッセイキット。

22. 請求項1-16のいずれかに記載の改変型グルコース脱水素酵素を含むグルコースセンサー。

☒ 1

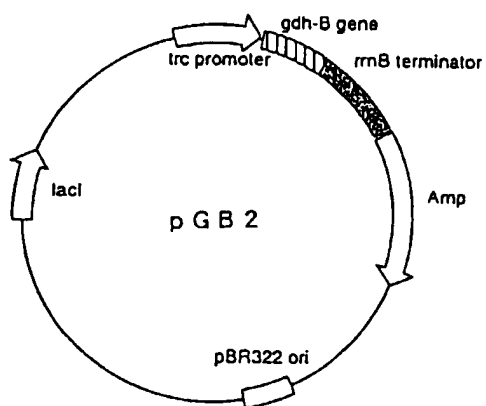


図 2

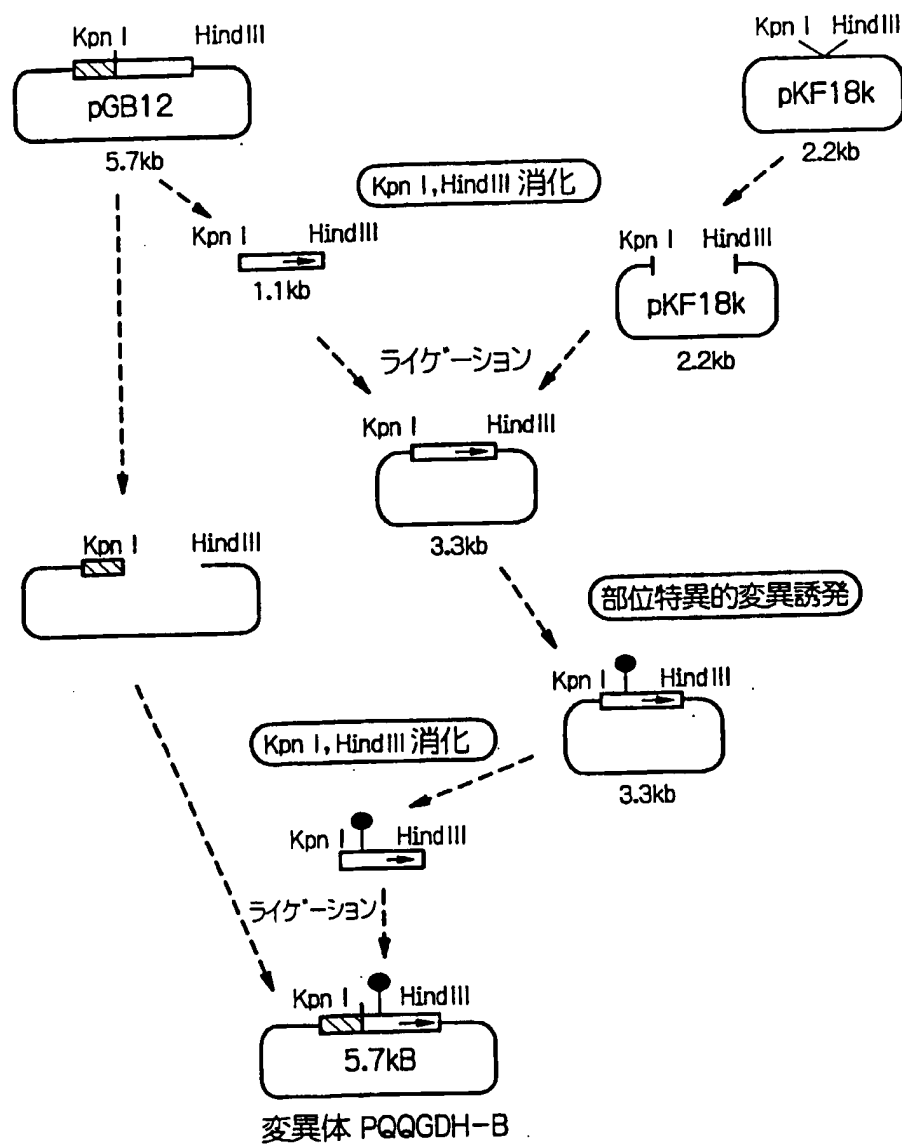
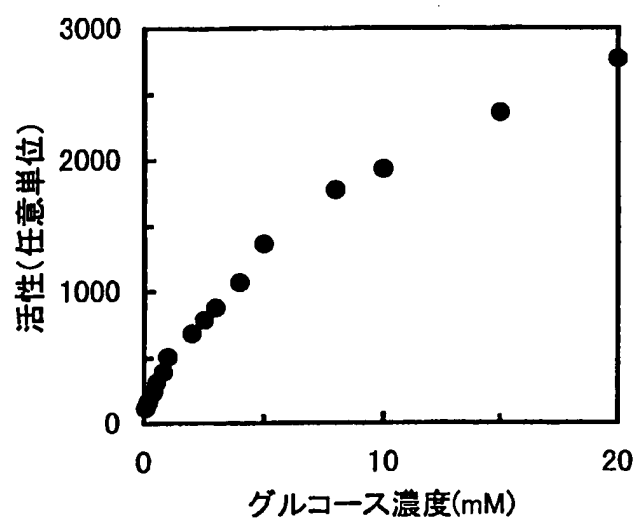


図 3



Sequence Listing

<110> Sode, Koji
 <120> Glucose Dehydrogenase
 5 <130> YCT493
 <150> JP 11-124285
 <151> 1999-4-30
 <150> JP 2000-9137
 <151> 2000-1-18
 10 <160> 15
 <210> 1
 <211> 454
 <212> PRT
 <213> Acinetobacter calcoaceticus
 15 <400> 1
 Asp Val Pro Leu Thr Pro Ser Gln Phe Ala Lys Ala Lys Ser Glu Asn
 1 5 10 15
 Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu
 20 25 30
 Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly
 35 40 45
 Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Glu Ser Gly Ser Val Lys Thr Val Phe
 50 55 60
 Gln Val Pro Glu Ile Val Asn Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu
 25 65 70 75 80
 Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys Asn Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile
 85 90 95
 Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn
 100 105 110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Ser Thr Asp Thr Leu
 115 120 125
 Glu Lys Pro Val Asp Leu Leu Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His
 130 135 140
 5 Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr
 145 150 155 160
 Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn
 165 170 175
 Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Gly Lys Asp Tyr
 10 180 185 190
 His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Ile
 195 200 205
 Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr
 210 215 220
 15 Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Thr Pro Asn Gly Lys
 225 230 235 240
 Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu
 245 250 255
 Ile Val Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys
 20 260 265 270
 Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Ala Asn Lys
 275 280 285
 Ser Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Val Lys Val Ala Ala Gly Val
 290 295 300
 25 Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro Pro
 305 310 315 320
 Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp Pro
 325 330 335
 Thr Cys Gly Glu Met Thr Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro Ser

340 345 350
 Ser Ala Tyr Val Tyr Lys Gly Gly Lys Lys Ala Ile Thr Gly Trp Glu
 355 360 365
 Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg Ile
 5 370 375 380
 Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Tyr Asp Asp Ala Val Pro Met
 385 390 395 400
 Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Asp Gly
 405 410 415
 10 Asn Val Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys Asp
 420 425 430
 Asp Gly Ser Val Thr Asn Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile Lys
 435 440 445
 Phe Thr Tyr Lys Ala Lys
 15 450

<210> 2

<211> 1612

<212> DNA

20 <213> *Acinetobacter calcoaceticus*

<400> 2

agctactttt atgcaacaga gcccttcaga aatttagatt ttaatagatt cgttattcat 60
 cataatacaa atcatataga gaactcgtac aaacccttta ttagaggttt aaaaattctc 120
 ggaaaatttt gacaatttat aaggtaggaca catgaataaa catttatigg ctaaaattgc 180
 25 ttatttaagc gctgttcagc tagttacact ctacgcatit gctgatgttc ctctaactcc 240
 atctcaattt gctaaagcga aatcagagaa ctttgacaag aaagttattc tatctaactc 300
 aaataagccg catgctttgt tatggggacc agataatcaa atttggttaa ctgagcgagc 360
 aacaggttaag attctaagag ttaalccaga gtcgggtagt glaaaaacag ttttcaggt 420
 accagagatt gcaatgatg ctgatgggca gaatggttta ttaggttttg ccttccatcc 480

tgattttaaa aataatccit atatctatat ttcaggtaca tttaaaaaatc cgaaatctac 540
 agataaagaa ttaccgaacc aaacgattat tctgtgttat acctataata aatcaacaga 600
 tacgtctgag aagccagtcg atttattagc aggattacct tcatcaaaag accatcagtc 660
 aggtcgtcct gtcattgggc cagatcaaaa gatitattat acgattgggtg accaagggcg 720
 5 taaccagctt gcttatttgi tcttgccaaa tcaagcacia calacgccaa ctcaacaaga 780
 actgaatggt aaagactatc acacctatat gggtaaagta ctacgcttaa atcttgatgg 840
 aaglattcca aaggataatc caagtittaa cgggggtggt agccatattt atacacttgg 900
 acatcgtaat ccgcagggct tagcatcac tccaaatggt aaattattgc agtcigaaca 960
 aggcccaaac tctgacgatg aaattaacct cattgtcaaa ggtaggcaatt atggtaggcc 1020
 10 gaatgtagca ggttataaag atgatagtgg ctatgcttat gcaaattatt cagcagcagc 1080
 caataagica attaaggatt tagctcaaaa tggagtataa gtagccgcag gggtccctgt 1140
 gacgaaagaa tctgaatgga ctggtaaaaa cttgttccca ccattaaaaa ctttataaac 1200
 cgttcaagat acctacaact ataacgatcc aacttggga gagatgacct acatttgcgtg 1260
 gccaacagtt gcaccgtcat ctgcctatgt ctataagggc ggtaaaaaag caattactgg 1320
 15 ttgggaaaat acattattgg ttccatcttt aaaacgtggt gtcattttcc gtattagtt 1380
 agatccaact tatagcacta cttatgatga cgctgtaccg atgtttaaga gcaacaaccg 1440
 ttatcgtgat gtgattgcaa gtccagatgg gaatgtctta tatgtattaa ctgalactgc 1500
 cggaaatgic caaaaagatg atggctcagt acaaaatata ttagaaaacc caggatctct 1560
 catlaagttc acctataagg ctaagtaata cagtcgcatt aaaaaaccga tc 1612

20

<210> 3

<211> 22

<212> PRT

<213> *Acinetobacter calcoaceticus*

25

<220>

<222> 10

<223> Xaa is any amino acid residue except for Glu

<220>

<222> 11

<223> Xaa is any amino acid residue except for Ile

<400> 3

Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Xaa Xaa Asn Leu Ile Val Lys

1

5

10

15

5 Gly Gly Asn Tyr Gly Trp

20

<210> 4

<211> 22

10 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 4

15 gaggttaatt gcatcgtcag ag 22

<210> 5

<211> 30

<212> DNA

20 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer for point mutation

<400> 5

caatgaggtt aatgttatcg tcagagtttg 30

25

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

- <220>
<223> primer for point mutation
<400> 6
gaggtaata tcatcgtcag ag 22
- 5
<210> 7
<211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
- 10 <220>
<223> primer for point mutation
<400> 7
gaggtaatt ttatcgtcag ag 22
- 15 <210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 8
caatgaggtt aatgtgatcg tcagagtttg 30
- <210> 9
- 25 <211> 22
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation

- <400> 9
gaggttaatt tgatcgtag ag 22
- <210> 10
5 <211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
- 10 <400> 10
caatgaggtt aattacatcg tcagagttg 30
- <210> 11
<211> 22
15 <212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 11
- 20 gaggttaatt ccatcgtag ag 22
- <210> 12
<211> 26
<212> DNA
25 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 12
caatgaggtt gaattcatcg tcagag 26

- <210> 13
<211> 30
<212> DNA
5 <213> Artificial Sequence
<220>
<223> primer for point mutation
<400> 13
gacaatgagg tgaatttcat cgtcagagtt 30
- 10
<210> 14
<211> 21
<212> PRT
<213> Acinetobacter calcoaceticus
- 15 <220>
<222> 1
<223> Xaa is any amino acid residue
<222> 5
<223> Xaa is any amino acid residue
- 20 <222> 8
<223> Xaa is any amino acid residue
<222> 9
<223> Xaa is any amino acid residue
<222> 10
- 25 <223> Xaa is any amino acid residue
<222> 15
<223> Xaa is any amino acid residue
<400> 14
Xaa Thr Ala Gly Xaa Val Gln Xaa Xaa Xaa Gly Ser Val Thr Xaa Thr

	1	5	10	15
	Leu Glu Asn Pro Gly			
	20			
5	<210> 15			
	<211> 17			
	<212> DNA			
	<213> Artificial Sequence			
	<220>			
10	<223> primer for point mutation			
	<400> 15			
	catcttttttg gacatgtccg gcagtat			17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/02872

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N15/63, C12N9/04, C12N1/19,
C12Q1/32, C12M1/34

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/53, C12N15/63, C12N9/04, C12N1/19,
C12Q1/32, C12M1/34

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICST FILE (JOIS)
GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Igarashi S. et al. "Construction and Characterization of mutant Water-Soluble PQQ Glucose Dehydrogenases with altered Km Values Site-Directed Mutagenesis Studies on the Putative Active Site" Biochem. Biophys. Res. Commun. (November, 1999) Vol.264, No.3, pp.820-824	1-22
X	Yoshida, H. et al. "Engineering a chimeric pyrroloquinone glucose dehydrogenase: improvement of EDTA tolerance, thermal stability and substrate specificity" Protein Engineering (January, 1999) Vol.12, No.1 pp.63-70	1-2, 17-22
X	JP, 10-243786, A (Koji Hayade), 14 September, 1998 (14.09.98) (Family: none)	1-2, 17-22
A	Cleton-Jansen, A. M. et al. "Cloning, characterization and DNA sequencing of the gene encoding the Mr 50000 quinoprotein glucose dehydrogenase from Acinetobacter calcoaceticus" Mol. Gen. Genet. (1989) Vol. 217, NO. 2/3 pp.430-436	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
01 August, 2000 (01.08.00)

Date of mailing of the international search report
08 August, 2000 (08.08.00)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/53, C12N15/63, C12N9/04, C12N1/19,
C12Q1/32, C12M1/34

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. C12N15/53, C12N15/63, C12N9/04, C12N1/19,
C12Q1/32, C12M1/34

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)
GenBank/DDBJ/EMBL/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
PX	Igarashi S. et al. "Construction and Characterization of mutant Water-Soluble PQQ Glucose Dehydrogenases with altered Km Values Site-Directed Mutagenesis Studies on the Putative Active Site" Biochem. Biophys. Res. Commun. (1999, Nov.) 第264巻 第3号 p. 820-824	1-22
X	Yoshida, H. et al. "Engineering a chimeric pyrroloquinone glucose dehydrogenase: improvement of EDTA tolerance, thermal stability and substrate specificity" Protein Engineering (1999, Jan.) 第12巻 第1号 p. 63-70	1-2, 17-22

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

01.08.00

国際調査報告の発送日

08.08.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

引地 進



4N

9549

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	JP, 10-243786, A (早出広司) 14.9月.1998 (14.09.98) (ファミリーなし)	1-2, 17-22
A	Cleton-Jansen, A. M. et al. "Cloning, characterization and DNA sequencing of the gene encoding the Mr 50000 quinoprotein glucose dehydrogenase from <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> " Mol. Gen. Genet. (1989) 第217巻 第2/3号 p. 430-436	1-22